

**European Language Institute**

*Founded 1938*

3844 Carnation Circle South  
Palm Beach Gardens, FL 33410-5636  
Tel.: (561) 622-1442 Fax.: (561) 622-3161

World Organisation for Intellectual Property  
International Office

PCT

Seal

International Registration as per agreement on  
international cooperation in the field of patents (PCT)

(51) International patent classification 6: G01N 33/68

A 1

(11) International publication number: WO 98/07036

(43) International date of publication: February 19, 1998

(21) International file number: PCT/EP97/04395

(22) International filing date: August 13, 1997

(30) Priority dates: 196 32 521.8 August 13, 1996 DB (DE?)

197 25 362.8 June 16, 1997 DB (DE?)

(71)(72) Filing person & Inventor: Wolf-Georg Forssman, Hannover

(72) Inventor, and (75) Inventor/Filing person (only for US):

Peter Schulz-Knappe, Hannover; Michael Schrader, Hannover; Hans-Georg Opitz, Hannover

(74) Attorneys: Hans-Wilhelm Meyers etc, Köln

(81) Designated states; AL, AU, ... (mostly illegible, pls compare with original)

Published: With International Research Report

*Before expiration of allowed term for changes in claims; publication will be repeated when changes arrive.*

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING THE STATUS OF AN ORGANISM BY PEPTIDE  
MEASUREMENT

(57) ABSTRACT: A process is disclosed for determining the status of an organism by measuring peptides in a sample of the organism which contains high-molecular and low-molecular peptides and acts as an indicator of the organism status. Low-molecular peptides are directly sensed and characterized, and are then correlated with a reference.

Note by translator:

For partly illegible full addresses of persons mentioned, please compare with original.

**European Language Institute**

*Founded 1938*

3844 Carnation Circle South

Palm Beach Gardens, Fl 33410-5636

Tel.: (561) 622-1442 Fax.: (561) 622-3161

WO 98/07036

PCT/EP97/04396

**Procedure to register the status of an organism  
by measuring the peptides.**

The subject of the invention on hand is a procedure to understand the status of an organism by measuring the peptides in a sample of that organism.

For the understanding of the status of an organism various analytical methods are applied. For example, in the diagnostics of higher organisms during pathological diagnoses it has been tried to fathom the cause of the pathological change on the basis of symptomatology in order to develop a causal therapy. It has further been endeavored to develop a reference of an average 'healthy' organism by sequencing the genomes of organisms and the establishment of 'wild type genomes', in order then to discover individual deviations by appropriate gene analyses, which can indicate possible pathogenic developments. The first methodical inception is prejudicial in as much as no diagnosis can be done without hypotheses, since in this a diagnosis is undertaken which is already based upon suppositions. The second procedure is detrimental, because at long sight it will not as yet be possible to diagnose important or even all illnesses which can be traced back to genetic malfunctions. A further disadvantage of the last mentioned method may also lie in the fact, that a mutation in a gene does not unconditionally lead to the expression of the thereby connected phenotype.

It would thus be desirable, to have at disposal a universally applicable diagnostic procedure, by which the mentioned disadvantages can be successfully avoided and in particular, a diagnosis free of hypotheses can be executed. The diagnostic procedure should further be universally applicable, and not be limited to higher developed systems, but be equally useful to grasp the status of low organisms. It should further be easily installed and be possible to execute the procedure with basically known techniques.

A technical problem which lies on the bottom of this invention is thus the provision of such a procedure.

Surprisingly, the underlying technical problem of the invention is solved in a simple way by the procedure with the features of claim 1. The subordinated claims concern preferred forms in execution of the procedure in accordance with this invention.

In conformity with this invention, the procedure for comprehending the status of an organism emanates from taking a specimen of the organism to be examined. The experiment can also be the complete organism. The test must contain low molecular peptides, whereas it does not interfere, if the specimen also contains high molecular peptides or proteins besides the low molecular peptides. The low molecular peptides, according to the invention, are grasped at this directly, characterized and serving as indicator for the status of the organism. At this it is possible as well, to grasp by the technique of measuring individual peptides directly, to collect by the technique of measuring more peptides and do so until all low molecular peptides are collected which are contained in the specimen and which can be grasped by the technique of measuring. Different than by the traditional analytic or diagnostic methods, like for example the gel-electrophoresis or the two-way electrophoresis and for example the clinical diagnostic methods, here the high molecular structures are not examined, like for instance the proteins. Contrary to basically known diagnostic methods like for example radioimmuno-assay or other competition-assays for the measuring of peptide hormones and similar, the low molecular peptides are, as per this invention, collected directly by the measuring technique, and not indirectly as in the mentioned methods. The distribution of low molecular peptides serves as reference in a representative cross section of defined controls.

In the procedure of the invention, the specimen of tissue or liquid tests to be examined and of which the status is to be measured, can be derived from the organism or it could be the organism itself or parts of it. In the case of examination of lower organisms, the organism itself serves preferably as specimen. In particular, protozoons are considered low organisms, like procaryote systems or simple eucaryote systems, like yeast or other micro-organisms.

In accordance with the invention, the low molecular peptides, which are pulled in for the measuring, should preferably show a molecular weight of maximal 30,000 Dalton. The lower margin in itself is not critical, however, dipeptides represent the

low frontier of the low molecular peptides which must be collected according to the invention. Particularly preferred are the molecular weights of the low molecular peptides from 100 to 10,000 Dalton.

If required, for example when needed because of a changed measuring layout, it can be of advantage to remove high molecular peptides or proteins from the specimen as well as other biopolymers, which potentially can interfere with the measurement. In particular, this is not required, when by the application of the measuring method according to the invention, the higher molecular peptides are not included in the measuring technique.

In the invention, the mass spectroscopy is preferably applied to seize the low molecular peptides. The so-called MALDI-method (matrix supported laser-desorption-ionisation-mass-spectroscopy) has proven particularly successful in this. When the mass-spectrometry is installed as method, it is recommended to use the data which can be determined by the mass-spectroscopy for the characterizing of the low molecular peptides, like, for example, their molecular weight. It is likewise possible, to analyze other parameters under certain circumstances, like, for example, the loading of the peptides or the characteristic time of retention of chromatographic columns, or a fragment pattern of the low molecular peptides, or combinations of mass of the low molecular peptides and their loadings.

Depending upon the statement of the problem, which is also connected with the gathering of the status of the organism, it may be of advantage, to distribute the specimen into several fractions and to analyze the samples by different formulations of the question or by a different layout of the measuring technique and thus to gather the status of the organism.

As organism serve in particular procaryote, eukaryote, multicellular organisms, cells of tissue cultures, cells of animals and humans. Thus it is possible through this invention, to examine the status of genetically altered or transformed and/or conditioned organisms. This can be of special advantage when examining transformed systems, in order to recognize to what extent transformed organisms have developed possibly unexpected or unwanted features, whilst, for example, peptides are formed, which indicate unwanted or unexpected properties, like toxic features. Noticibly, any deliberate or unawarely undertaken manipulation (conditioning) of an organism can influence its status, be it within the framework of administering medications, the genetherapy, with infections, at the place of work by

contact with chemical materials, with laboratory animals, in particular with transgene animals and knock-out mutants. Especially with such procedures, it can be scrutinized by intra- and inter-individual comparisons, for example by chronologic collection of specimens from the organism before and during the duration of one of the above mentioned measures, or by comparison with untreated control organisms, whether predicted, desirable changes in status have in fact occurred, and whether, moreover or instead of it not forecast, undesirable or even desirable alterations have entered, which are collected by the procedure of the invention, free of hypotheses.

For this reason the procedure of the invention is also suited for example to accompany clinical studies, toxicologic examinations, when testing medicines of all kinds, for the analysis / gathering of decomposition products, and for the analysis of gene products.

In the veterinary- and human medical science the procedure of the invention evolves into its surpassing importance, by making it feasible to gather, without hypotheses the status of the organism in question. Therefore no confirmation assay is executed with an already preconceived opinion, but moreover a genuine total picture of the status of the examined organism becomes available. The procedure of the invention, which can be described as differential peptide display, emanates in this from that in a healthy organism there is a certain peptide pattern, which is therefore in the position to serve as reference standard. Taking now the peptide status of an individual and comparing it with the reference, one can on the one hand determine deviations, which already give a first indication of a possible photogenous condition. When these deviations, which have been established by comparison with similar photogenous conditions, are established from appropriate specimens of a sick person, the disease in question can already be directly identified from the analysis by comparison of the deviations in the peptide pattern of the specimen of the individual and by conformity of the deviation with an assigned clinical picture.

In accordance with the invention one can in particular proceed with this as follows: For the creation of a reference specimen one can use above all ultra filtrates of body fluids and tissue extracts. The collection of filtrate peptides and their fractionation into fractions is done whilst, for example, low molecular peptide fractions are extracted. The characterizing of the peptide fractions can be done, for example, by means of retention behavior and molecular mass, ascertainable by chromatography or mass spectroscopy. If, for example, ultra filtrates of patients are

utilized, who suffer from a known disease, and these are compared with the previously established spectrum of healthy reference test subjects, an assignment of the specific disease with the status of the peptide mixture in question can be accomplished according to the deviation of the pattern. The method by itself thus can also be applied in traditional ways, in that for example the appropriate peptide sample which indicates pathogenic changes, is directly scrutinized. In special cases this could even be a characteristic peptide for the appropriate disease. When a specimen of a patient is analyzed, for example, with whom a certain syndrome is discernible, and there exists a hypothesis for the cause of this disease, this specific peptide, for example, can also be scrutinized in the analysis, according to the invention, and with positive results the appropriate therapy plans can be established. It is entirely possible, to extract first a specimen from the patient, and to establish a status with the procedure of the invention, in order then, while determining the presence of a deviation indicating pathogenic conditions, to perform a control measuring either by basically known confirmation assays, by employing the usual clinical assays, or to do it by control measuring through specific screening as per the indicator of the pathogenic condition.

Peptides could be extracted in this, after a procedure which is known to the expert, like for example, by ultra filtration of the appropriate source. For this filters are used with a molecular exclusion size which lie within the range required in accordance with the invention, thus between one Dipeptide and maximal 30,000 Dalton. By suitable choice of the respective membranes, certain molecular weight fractions can also be extracted. Preferably 0.2 ml to 50 l filtrate are extracted in the frame of the filtration, which, for example, immediately after the termination of the filtration is stabilized to a pH value of 2-4 by acidulation with diluted hydrochloric acid. The mentioned quantities serve in particular to examine pooled specimens, on one side to develop reference samples of healthy probands, respectively to determine specific disease peptide markers to establish a peptide data bank.

The peptides, which are available in the filtrate after ultra filtration are extracted by absorption onto chromatographic materials, above all the cation exchanger, as for example fracto gel, anion-exchange resin fracto gel TMAE and reverse phase (RP) materials, with subsequently following elution by linear gradients or by shoulder gradients. For the further purification, if need be, further chromatographic isolations, in particular over RP-phase material, can be done.

The collecting of the peptide fractions is preferably done by mass spectrometric analysis, in particular with the MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry), or the ESI-MS (electro spray ionisation-MS). These are methods which can be applied for the analysis of peptides. With this it is preferably worked with an on-line coupling of a micro bore RP-isolation and the mass spectrometry (LC-MS-coupling). From the gained data a multidimensional table by retention behavior, molecular weight, and signal intensity, as preferred guide parameter, is created. Also other readings, however, which become available with the mentioned methods can be gathered.

The data gained from patients with a known basic disease, via the above mentioned steps, are compared with the data which were gathered in the same way from a healthy reference population. With this, both qualitative changes (for example the appearance of new peptides or the missing of peptides), as well as quantitative changes (the increased, respectively the decreased appearance of individual peptides) are ascertained. The targets, which were defined by the comparing analysis, can, if needed, be furthermore purified and identified peptide chemically by methods which are known to the expert. The received sequence information can then be compared with protein- and nucleic acid data banks and subsequently also with literature data. The relevance of the described peptides, in reference to the scrutinized disease, is examined by functional studies and by serial screening of suitable patient groups.

#### Example 1

Use of body fluids, here: Blood filtrate (Hemo filtrate, HF)

HF is executed by techniques which are known to the expert in the frame of an arterial-venous or also venous hemo filtration on selected patients or probands. The extraction of HF is done in the way, as it is principally and routinely done on patients, with chronic nephropathy. Through an arterial drainage and venous afference (arterial-venous HF) or a venous drainage with venous afference (veno-venous HF), the blood of the patient is - with apparatus support - channeled through a hemo filter device (for example Hemo Processor, Sartorius, Göttingen; AK 10 HFM, Gambro, Hechingen) over a hemo filter (for example Hemoflow F 60 or Hemoflow HF 80 S, Fresenius, Bad Homburg; Hemoflow FH 77 H and Hemoflow HF 88 H, Gambro), which has a molecular exclusion size of up to 30 kDa. The filtrate volume which was withdrawn from the patient is replaced by an electrolyte solution (for example SH 01,

SH 05, SH 22, SH 29, Schiwa, Glandorf).

In the frame of the procedure on hand a diagnostic hemo filtration is executed with the goal, to collect between 1 and 30 l HF from a patient within a hemo filtration. The hemo filtrate, to avoid proteolysis, is immediately adjusted to a pH value between 2 and 4 with diluted acid (for example 1 M HCl), and cooled down to 4°C.

## 2. Collecting of HF-peptides and undoing into fractions.

### 2.1 Peptide extraction with gradual elution.

10 l hemo filtrate is thinned down to a conductivity of 6 mS/cm with deionised water and the pH adjusted to 2.7 with hydrochloric acid. The HF is then applied on to a chromatographic column. After bonding of the HF-peptides, the bonded peptides are eluted with a pH graduated elution. In this, 7 buffers with ascending pH are employed.

#### Chromatography requirements:

Flow at filling:	100 ml/min
Flow at eluting:	30 ml/min
Detection:	214, 280 nm
Column:	Vantage (Amicon, Witten), diameter 6 cm x 7 cm filling height
Column material:	Fraktogel TSK SP 650 M (Merck, Darmstadt)
Apparatus:	BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden- Nordenstadt

Buffer	pH	Buffer Substances	Molarity
Elution buffer 1	3.6	citric acid	0.1
Elution buffer 2	4.5	acetic acid	0.1
Elution buffer 3	5.0	malic acid	0.1
Elution buffer 4	5.6	succinic acid	0.1
Elution buffer 5	6.6	sodium dihydrogen phosphate	0.1
Elution buffer 6	7.4	disodium hydrogen phosphate	0.1
Elution buffer 7	9.0	ammonium carbonate	0.1

The eluates 1-7 are collected separately



## 2.2 Second chromatographic undoing

The eluates 1 - 7 are chromatographed separately over a reverse phase column.

Chromatographic requirements:

Flow at filling: 10 ml/min

Flow at eluting: 4 ml/min

Detection: 214 nm

Column: HPLC-Steel column, diameter 1 cm, filling height 12.5

Column material: Source RPC 15  $\mu$ m (Pharmacia, Freiburg)

Apparatus: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

The eluate is collected in 4 ml-fractions.

## 3. The mapping (filing?) of the peptide-fractions

### 3.1

Aliquots of the collected fractions in 2.2 are spread on a microbore-reverse-phase-column and eluted in gradient. The detection is done with a UV-detector and on-line with an electrospray-mass-spectrometer.

Chromatographic requirements:

Flow at filling: 20  $\mu$ l/min

Flow at eluting: 20  $\mu$ l/min

Detection: 220 nm

Column: C18 AQS, 3  $\mu$ m, 120 A, diameter 1 mm, length 10 cm (YMC, Schermbeck)

Apparatus: ABI 140 B Dual solvent delivery system

Buffer A: 0.06% trifluor acetic acid in water

Buffer B: 80% acetonitrile in A

Gradient: 0% B on 100% B in 90 min

On-line mass spectrometry:

API III with electrospray -interface (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Positive Ion Modus

Measuring range:  $m/z$  from 300 to 2,390

Scan-time: 7 sec.

Scan-window: 0.25  $m/z$

Data collecting is done with MacSpec or MultiView software (Perkin-Elmer).

### 3.2 MALDI-MS measuring of the individual fractions

Aliquots of the fractions which were collected in 2.2 are measured with variable matrix substances, for example with additive of L (-) fucose in MALDI-MS.

From the crude data a multidimensional chart is established with regard to the scan number, signal intensity, and after calculation of the masses from the multiply loaded ions of a scan.

## 4. Comparative analysis

### 4.1 Identification of new, missing, or in their mass clearly different peptides

By comparing the under 3.3 preserved data statements, which can also be called peptide chart, qualitative and/or quantitative differences can be determined. In this, in regard to controls and specimens, individual data records or also groups of data records are drawn upon for comparison.

## 4.2 Peptide chemically characterizing the identified targets.

Of the collected raw material (for example bulk preparations of hemo filtrates) the identified targets are cleaned up in quantities, which permit identification. For this, as known to the expert, the various chromatographic separation techniques (reverse phase, ion exchange, size exclusion chromatography, hydrophobic interaction chromatography, etc.) are applied, as they are generally implemented to undo peptide mixtures. After every chromatographic separation of a fraction, the targets are once more identified over ESI-MS, MALDI-MS or also LC-MS in the fractions. This procedure is repeated under variation of the chromatographic parameters so many times, until a clean product of the sought after specification, i.e., retention time and molecular mass, is on hand. After this the definition of a partial- or complete amino acid sequence or fraction pattern follows. In addition a data bank comparison is done with the known data banks (Swiss-Prot and EMBL-Peptide- and Nucleic acid - data bank) with the aim of identification of the partial- or complete sequence or of a fraction pattern. If no data bank entry exists, the clarification of the primary structure follows.

### Example 2:

Use of body fluids, here: ascites

#### 1. Collection of ascites

Ascites are formed as extra vasal exudate during various diseases (malignant tumors, liver malfunctions etc). In the frame of the procedure on hand, between 10 ml and 10 l of ascites are collected by puncture, and then to avoid proteolysis immediately adjusted with diluted acid (for example 1 M HCl) to a pH value between 2.0 and 4.0 and cooled down to 4°C. After ultra filtration over a cellulose triacetate membrane with an exclusion size of 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatus, Sartorius), the filtrate is used as source of peptides from there on.

#### 2. Extraction of ascite-peptides and separation in fractions

##### 2.1. Peptide extraction with gradient-elution

5 l ascite filtrate is adjusted to pH 2.0 and separated over a preparative reverse - phase- column.

Chromatographic requirements:

Flow at filling: 40 ml/min  
Flow at eluting: 40 ml/min  
Detection: 214 nm, 280 nm  
Column: Waters cartridge system, diameter 4.7cm, filling height 30cm  
Column material: Vydac RP-C18, 15 - 20  $\mu$ m  
Apparatus: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt  
Buffer A: 0.1% trifluoroacetic acid in water  
Buffer B: 80% acetonitrile in A  
Gradient: 0% B to 100% B in 3,000 ml

The eluate is collected in 50 ml fractions.

The further course of characterizing corresponds with example 1.

Example 3:

Use of body liquids, here: urine

1. Collection of urine

Urine is collected directly as catheter specimen or as spontaneous urine of 0.5 to 50 l, and to avoid proteolysis immediately adjusted to a pH value of between 2.0 and 4.0 with diluted acid (for example 1 M HCl) and cooled down to 4°C. After ultrafiltration over a cellulose triacetate membrane with an exclusion size of 30 kDa (Sartocon-Mini-apparatus, Sartorius) the filtrate is used as source of peptides from there on.

2. Collection of urine-peptide and separation into fractions

2.1 Peptide extraction with graduated elution

10 l urine-filtrate are diluted with water to a conductivity of 6 mS/cm and the pH value adjusted to 2.7. The urine-filtrate is then spread upon a chromatographic column. After binding of the peptides, the bound peptides are eluted with a common salt gradient.

Chromatographic requirements:

Flow at filling: 100 ml/min  
Flow at eluting: 30 ml/min  
Detection: 214 nm  
Column: Vantage (Amicon, Witten) diameter 6cm x 7 cm filling height  
Column material: Merck Fraktogel TSK SP 650 M  
Apparatus: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt  
Buffer A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3.0  
Buffer B: 1.5 M NaCl in A  
Gradient: 0% B to 100% B in 2,000 ml

The eluate is collected in 10 pools á 200 ml.

2.2 second chromatographic separation

The fractions are chromatographed separately over a reverse-phase- column.

Chromatographic requirements:

Flow at filling: 10 ml/min  
Flow at eluting: 4 ml/min  
Detection: 214 nm  
Column: HPLC steel column, diameter 1cm x 12.5 cm filling height  
Column material: Pharmacia source RPC 15 µm  
Apparatus: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt  
Buffer A: 0.1% trifluoroacetic acid in water  
Buffer B: 80% acetonitrile in A  
Gradient: 0% B to 100% B in 200 ml

The eluate is collected in 4 ml fractions.

The further course of characterizing corresponds with example 1.

### C l a i m s

1. Procedures to record the status of an organism by measuring the peptides of a specimen of the organism, which contains high- and low molecular peptides, as indicator for the status of the organism, whereas
  - low molecular peptides are directly collected and characterized,
  - and are placed in relation to a reference.
2. Procedures as per claim 1, whereas the specimen, tissue- or fluid samples, are from the organism, or are the organism itself, or combinations of both.
3. Procedures as per claim 1 and/or 2, whereas the low molecular peptides, which are drawn upon for measuring, show a molecular weight of maximal 30,000 Dalton.
4. Procedures as per claim 3, whereas the low molecular peptides, which are drawn upon for measuring, show at least a molecular weight which corresponds to that of the dipeptides.
5. Procedures as per claim 3 and/or 4, whereas the low molecular peptides, which are drawn upon for measuring, show a molecular weight of between 100 and 10,000 Dalton.
6. Procedures as per at least one of the claims 1 to 5, whereas the high molecular peptides are separated before the measuring of the low molecular peptides, or are in the technique of measuring or in the technique of evaluation not taken into consideration.

-14-

7. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 6, whereas the collection of the low molecular peptides is done by mass spectrometry.
8. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 7, whereas the low molecular peptides are characterized by measuring their molecular weight.
9. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 8, whereas the specimen before measuring the low molecular peptides is divided into various fractions and measured under different conditions.
10. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 9, whereas prokaryotes, eukaryotes, multicellular organisms, cells from tissue cultures, cells from animals and humans serve as organisms.
11. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 10, whereas the specimen originates from genetically changed or transformed, and/or conditioned organisms.
12. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 11, whereas the understanding of the status of the organism serves for the examination, without hypotheses, and mapping (picture) of the status of the total organism, to discover possible deviations from a reference condition.
13. Procedures as per at least one of the claims from 1 to 11, whereas the understanding of the status of a transformed organism serves for the examination, free of hypotheses, and mapping (picture) of the status of the total organism to discover mutations of the transformed organism, to discover the appearance of peptides in connection with the transformation which are causally connected with changes in metabolic processes.

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  G01N 33/68	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 98/07036  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. Februar 1998 (19.02.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/04396  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 13. August 1997 (13.08.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 32 521.8      13. August 1996 (13.08.96)      DE 197 25 362.8      16. Juni 1997 (16.06.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHRADER, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). OPITZ, Hans-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> PROCESS FOR DETERMINING THE STATUS OF AN ORGANISM BY PEPTIDE MEASUREMENT  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR ERFASSUNG DES STATUS EINES ORGANISMUS DURCH MESSUNG VON PEPTIDEN  <b>(57) Abstract</b>  A process is disclosed for determining the status of an organism by measuring peptides in a sample of the organism which contains high-molecular and low-molecular peptides and acts as an indicator of the organism status. Low-molecular peptides are directly sensed and characterised, and are then correlated with a reference.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hoch- und niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.		



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Erfassung des Status eines  
Organismus durch Messung von Peptiden

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus.

Zur Erfassung des Status eines Organismus werden verschiedene analytische Methoden eingesetzt. So wird beispielsweise in der Diagnostik von höheren Organismen bei pathologischen Befunden aufgrund der Symptomatik versucht, die Ursache der pathologischen Veränderung zu ergründen, um eine kausale Therapie zu entwickeln. Desweiteren ist man bemüht, durch Sequenzierung der Genome von Organismen und Etablierung von "Wildtyp-Genomen" eine Referenz eines durchschnittlichen, "gesunden" Organismus zu entwickeln, um dann individuelle Abweichungen, die auf mögliche pathogene Entwicklungen hinweisen können, durch entsprechende Genanalysen zu entdecken. Nachteilig an dem ersten methodischen Ansatz ist, daß man keine hypothesenfreie Diagnostik durchführen kann, da dabei eine Diagnose unternommen wird, die bereits auf Vermutungen beruht. Nachteilig an dem zweiten Verfahren ist, daß es auf lange Sicht noch nicht möglich sein wird, wichtige

- 2 -

oder gar alle auf genetische Fehlfunktionen zurückzuführende Erkrankungen zu diagnostizieren. Ein weiterer Nachteil der zuletzt genannten Methode kann auch darin bestehen, daß eine Mutation auf einem Gen nicht unbedingt zur Expression des damit verbundenen Phänotypen führt.

Es wäre mithin wünschenswert, über ein universell einsetzbares diagnostisches Verfahren zu verfügen, mit welchem es gelingt, die geschilderten Nachteile zu vermeiden und insbesondere eine hypothesenfreie Diagnostik durchführen zu können. Das diagnostische Verfahren sollte darüber hinaus universell einsetzbar sein, nicht beschränkt bleiben auf höher entwickelte Systeme, sondern auch gleichfalls einsetzbar sein, um den Status von niederen Organismen zu erfassen. Es sollte darüber hinaus leicht etablierbar sein und mit an sich bekannten Techniken ausgeführt werden können.

Ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem liegt mithin in der Bereitstellung eines solchen Verfahrens.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem in einfacher Weise durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus geht davon aus, daß dem zu untersuchenden Organismus eine Probe entnommen wird. Die Probe kann auch der vollständige Organismus sein. Die Probe muß niedrigmolekulare Peptide enthalten, wobei es nicht stört, wenn die Probe neben niedrigmolekularen Peptiden auch hochmolekulare Peptide oder Proteine enthält. Die niedrigmolekularen Peptide werden dabei erfindungsgemäß direkt erfaßt und charakterisiert und dienen als Indikator für den Status des Organismus. Dabei ist es sowohl möglich, einzelne Peptide direkt meßtechnisch zu erfassen, mehrere Peptide meßtechnisch zu

erfassen bis hin zu allen in der Probe befindlichen und meßtechnisch erfaßbaren niedermolekularen Peptide. Anders als bei herkömmlichen analytischen oder diagnostischen Methoden, wie die Gel-Elektrophorese oder die zweidimensionale Elektrophorese und beispielsweise klinische diagnostische Methoden, werden hier nicht die hochmolekularen Strukturen, wie beispielsweise Proteine untersucht. Im Gegensatz zu an sich bekannten diagnostischen Methoden, wie beispielsweise Radioimmunoassay oder anderen Kompetitionsassays zur Messung von Peptidhormonen und ähnlichem, werden erfindungsgemäß die niedermolekularen Peptide direkt meßtechnisch erfaßt und nicht wie in den genannten Methoden indirekt. Als Referenz dient die Verteilung niedrigmolekularer Peptide bei einem repräsentativen Querschnitt von definierten Kontrollen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die zu untersuchende Probe von Geweben- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus, dessen Status aufgenommen werden soll, stammen oder es kann der Organismus selbst oder Teile davon sein. Im Falle der Untersuchung niederer Organismen dient vorzugsweise der Organismus selbst als Probe. Als niedere Organismen kommen insbesondere Einzeller, wie prokaryontische Systeme oder einfache eukaryontische Systeme, wie Hefen oder andere Mikroorganismen, in Betracht.

Erfindungsgemäß sollen die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 30.000 Dalton aufweisen. Die untere Grenze ist an sich nicht kritisch, jedoch stellen Dipeptide die untere Grenze der niedrigmolekularen Peptide, die erfindungsgemäß erfaßt werden sollen, dar. Insbesondere bevorzugt sind Molekulargewichte der niedrigmolekularen Peptide von 100 bis 10.000 Dalton.

Falls erforderlich, weil beispielsweise durch eine veränderte Meßanordnung bedingt, kann es vorteilhaft sein, hochmole-

kulare Peptide oder Proteine sowie andere Biopolymere, die möglicherweise mit der Messung interferieren, aus der Probe zu entfernen. Dies ist insbesondere dann nicht erforderlich, wenn durch die erfindungsgemäß einzusetzende Meßmethode die höhermolekularen Peptidverbindungen meßtechnisch nicht erfaßt werden.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß die Massenspektroskopie zur Erfassung der niedermolekularen Peptide eingesetzt. Insbesondere bewährt hat sich dabei die sogenannte MALDI-Methode (Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie). Wird die Massenspektrometrie als Methode eingesetzt, empfiehlt es sich, die durch die Massenspektroskopie ermittelbaren Daten zur Charakterisierung der niedermolekularen Peptide einzusetzen, wie beispielsweise deren Molekulargewicht. Es ist ebenfalls möglich, unter bestimmten Umständen andere Parameter zu analysieren, wie beispielsweise die Ladung der Peptide oder die charakteristische Retentionszeit auf Chromatographiesäulen oder ein Fragmentmuster der niedermolekularen Peptide oder Kombinationen aus Masse der niedermolekularen Peptide und deren Ladungen.

Je nach Fragestellung, die mit der Erfassung des Status des Organismus noch verbunden ist, kann es vorteilhaft sein, die Probe auf mehrere Fraktionen zu verteilen und die Proben unter verschiedenen Fragestellungen oder meßtechnischen Anordnungen zu analysieren und somit einen Status des Organismus zu erfassen.

Als Organismen dienen insbesondere Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen von Tieren und Menschen. So wird es erfindungsgemäß ermöglicht, den Status von genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen zu untersuchen. Dies kann insbesondere bei Überprüfungen von transformierten Systemen vorteilhaft sein, um zu erkennen, inwie-

- 5 -

weit transformierte Organismen möglicherweise unerwartete oder unerwünschte Eigenschaften entwickelt haben, indem beispielsweise Peptide gebildet werden, die auf unerwünschte oder unerwartete Eigenschaften, wie toxische Eigenschaften, hinweisen.

Insbesondere kann jede bewußt oder unbewußt vorgenommene Manipulation (Konditionierung) eines Organismus dessen Status beeinflussen, sei es im Rahmen der Verabreichung von Medikamenten, der Gentherapie, bei Infektionen, am Arbeitsplatz durch Kontakt mit chemischen Stoffen, bei Versuchstieren, insbesondere transgenen Tieren und knock-out-Mutanten. Insbesondere bei solchen Verfahren kann durch den intra- und inter-individuellen Vergleich, beispielsweise durch chronologische Probenentnahme aus einem Organismus vor und im Verlauf einer der oben genannten Maßnahmen oder durch Vergleich mit nicht behandelten Kontrollorganismen, überprüft werden, ob die vorhergesagten, erwünschten Änderungen im Status tatsächlich eingetreten sind und ob darüberhinaus oder stattdessen nicht vorhergesagte, unerwünschte oder auch erwünschte Änderungen eingetreten sind, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hypothesenfrei erfaßt werden.

Daher eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zum Beispiel zur Begleitung von klinischen Studien, toxikologischen Untersuchungen bei der Erprobung von Medikamenten aller Art, zur Analyse/Erfassung von Abbauprodukten, zur Identifikation von Genprodukten.

In der Veterinär- und Humanmedizin entwickelt das erfindungsgemäße Verfahren seine überragende Bedeutung dadurch, daß eine hypothesenfreie Erfassung des Status des betreffenden Organismus ermöglicht wird. Es wird also nicht bereits mit einer vorgefaßten Meinung ein Bestätigungsassay durchgeführt, sondern es wird ein echtes Gesamtbild des Status des untersuchten Organismus erstellbar. Das erfindungsgemäße Verfahren, daß als differentiell Peptiddisplay (Differential

Peptide Display) bezeichnet werden kann, geht dabei davon aus, daß in einem gesunden Organismus ein bestimmtes Peptidmuster vorhanden ist und deshalb in der Lage ist, als Referenzstandard zu dienen. Nimmt man nun den Peptidstatus eines Individuums auf und vergleicht diesen mit der Referenz, so kann man einerseits Abweichungen feststellen, die bereits einen ersten Hinweis auf einen möglicherweise pathogenen Zustand geben. Werden nunmehr die Abweichungen, die durch Vergleich mit ähnlichen pathogenen Zuständen erstellt worden sind, aus entsprechenden Proben eines Erkrankten ermittelt, so kann bereits durch Vergleich der Abweichungen im Peptidmuster der Probe des Individuums und Übereinstimmung der Abweichung mit einem zugeordneten Krankheitsbild die betreffende Erkrankung direkt aus der Analyse identifiziert werden.

Erfindungsgemäß kann dabei insbesondere wie folgt vorgegangen werden. Zur Herstellung einer Referenzprobe können zunächst Ultrafiltrate aus Körperflüssigkeiten und Gewebsextrakten verwendet werden. Die Gewinnung der Filtratpeptide und ihre Auftrennung in Fraktionen erfolgt, indem beispielsweise niedrigmolekulare Peptidfraktionen gewonnen werden. Die Charakterisierung der Peptidfraktionen kann beispielsweise anhand von Retentionsverhalten und molekularer Masse, ermittelbar durch Chromatographie oder Massenspektroskopie, erfolgen. Wird beispielsweise Ultrafiltrat von Patienten, die an einer bekannten Erkrankung leiden, verwendet und dieses mit dem zuvor erstellten Spektrum von gesunden Referenzprobanden verglichen, kann durch das abweichende Muster eine Zuordnung der spezifischen Erkrankung mit dem Status des betreffenden Peptidgemisches erfolgen. Die Methode kann somit auch in an sich herkömmlicher Weise eingesetzt werden, indem beispielsweise gleich das entsprechende auf pathogene Veränderungen hinweisende Peptidmuster abgefragt wird. Im Einzelfall kann dies sogar ein für die entsprechende Krankheit charakteristisches Peptid sein. Analysiert man z. B. eine Probe aus einem Patienten, bei dem ein bestimmtes

Erkrankungsbild erkennbar ist und eine Hypothese für die Ursache dieser Erkrankung besteht, kann beispielsweise dieses spezifische Peptid in der Analyse gemäß Erfindung ebenfalls abgefragt werden und bei positivem Ausgang entsprechende Therapiepläne eingerichtet werden. So ist es durchaus möglich, zunächst dem Patienten eine Probe zu entnehmen, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einen Status aufzunehmen, um dann bei Feststellen des Vorliegens einer auf pathogene Zustände hinweisenden Abweichung entweder durch an sich bekannte Bestätigungsassays, unter Heranziehung der üblichen klinischen Assays, eine Kontrollmessung durchzuführen oder die Kontrollmessung durch spezifisches Screening nach dem Indikator des pathogenen Zustands durchzuführen.

Peptide können dabei nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise Ultrafiltration des entsprechenden Ausgangsmaterials, gewonnen werden. Dabei werden Filter mit einer molekularen Ausschlußgröße verwendet, die in dem erfindungsgemäß beanspruchten Bereich liegen, also zwischen denen eines Dipeptides und maximal 30.000 Dalton. Durch geeignete Wahl der jeweiligen Membranen können auch bestimmte Molekulargewichtsfractionen gewonnen werden. Vorzugsweise werden im Rahmen der Filtration 0,2 ml bis 50 l Filtrat gewonnen, das beispielsweise sofort nach Abschluß der Filtration durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 bis 4 eingestellt wird. Die genannten Mengen dienen insbesondere dazu, gepoolte Proben zu untersuchen, zum einen zur Entwicklung von Referenzproben gesunder Probanden bzw. zur Bestimmung krankheitsspezifischer Peptidmarker zur Erstellung einer Peptiddatenbank.

Die nach Ultrafiltration im Filtrat vorliegenden Peptide werden durch Adsorption an chromatographische Materialien, insbesondere Kationenaustauscher, wie beispielsweise Fractogel, Anionenaustauscher-Fractogel TMAE und Reverse-Phase-(RP)-Materialien, mit nachfolgender Elution durch lineare Gradienten oder Stufengradienten gewonnen. Zur weiteren



Aufreinigung können gegebenenfalls weitere chromatographische Trennungen, insbesondere über RP-Phasenmaterial durchgeführt werden.

Die Erfassung der Peptidfraktionen erfolgt vorzugsweise durch massenspektrometrische Analyse, insbesondere mit der MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry) oder ESI-MS (electro spray ionisation-MS). Dies sind Methoden, die zur Analyse von Peptiden einsetzbar sind. Hierbei wird vorzugsweise mit einer On-Line-Kopplung einer Microbore RP-Trennung und der Massenspektrometrie (LC-MS-Kopplung) gearbeitet. Aus den erhaltenen Daten wird eine mehrdimensionale Tabelle nach Retentionsverhalten, Molekulargewicht und Signalintensität als bevorzugte Leitparameter erstellt. Es können jedoch auch andere mit den genannten Methoden ermittelbare Größen erfaßt werden.

Die über die vorgenannten Schritte gewonnenen Daten über Patienten mit einer bekannten Grunderkrankung werden mit den gleichartig gewonnenen Daten einer gesunden Referenzpopulation verglichen. Hierbei werden sowohl qualitative Änderungen (z. B. das Auftreten neuer Peptide oder das Fehlen von Peptiden), als auch quantitative Änderungen (das vermehrte beziehungsweise verminderte Auftreten von einzelnen Peptiden) festgestellt. Die über die vergleichende Analyse definierten Targets können, falls erforderlich, im weiteren durch den Fachmann bekannte Methoden peptidchemisch gereinigt und identifiziert werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen können dann mit Protein- und Nucleinsäuredatenbanken sowie nachfolgend mit Literaturdaten verglichen werden. Die Relevanz der dargestellten Peptide bezüglich der untersuchten Erkrankung wird überprüft durch funktionelle Studien und durch Reihenscreening an geeigneten Patientengruppen.

### Beispiel 1

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Blutfiltrat (Hämo-  
filtrat, HF)

#### 1. Gewinnung von HF

HF wird im Rahmen einer arterio-venösen oder auch veno-venösen Hämofiltration nach dem Fachmann bekannten Techniken an ausgewählten Patienten oder Probanden durchgeführt. Die Gewinnung von HF erfolgt in der Weise, wie sie im Prinzip bei chronisch nierenkranken Patienten routinemäßig durchgeführt wird. Über eine arterielle Ableitung und venöse Zuleitung (arterio-venöse HF) oder eine venöse Ableitung mit venöser Zuleitung (veno-venöse HF) wird das Blut des Patienten unter apparativer Unterstützung durch ein Hämo-filtratsgerät (z. B. Hemoprozessor, Sartorius, Göttingen; AK 10 HFM, Gambro, Hechingen) über ein Hämofilter geleitet (z. B. Hemoflow F 60 oder Hemoflow HF 80 S, Fresenius, Bad Homburg; Hemoflow FH 77 H und Hemoflow HF 88 H, Gambro), das eine molekulare Ausschlußgröße von bis zu 30 kDa besitzt. Das dem Patienten entzogene Filtratvolumen wird durch eine Elektrolytlösung substituiert (z. B. SH 01, SH 05, SH 22, SH29, Schiwa, Glandorf).

Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens wird eine diagnostische Hämofiltration mit dem Ziel durchgeführt, zwischen 1 und 30 l HF bei einem Patienten innerhalb einer Hämofiltration zu gewinnen. Das Hämofiltrat wird zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 4 eingestellt und auf 4°C gekühlt.

## 2. Gewinnung der HF-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

### 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Hämofiltrat werden mit entionisiertem Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit Salzsäure auf 2,7 eingestellt. Das HF wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der HF-Peptide werden die gebundenen Peptide mit einer pH-Stufenelution eluiert. Dabei werden 7 Puffer mit aufsteigendem pH verwendet.

#### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214, 280 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Fraktogel TSK SP 650 M (Merck, Darmstadt)

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Molarität
Elutionspuffer 1	3,6	Zitronensäure	0,1
Elutionspuffer 2	4,5	Essigsäure	0,1
Elutionspuffer 3	5,0	Apfelsäure	0,1
Elutionspuffer 4	5,6	Bernsteinsäure	0,1
Elutionspuffer 5	6,6	Natriumdihydrogenphosphat	0,1
Elutionspuffer 6	7,4	Dinatriumhydrogenphosphat	0,1
Elutionspuffer 7	9,0	Ammoniumcarbonat	0,1

Die Eluate 1 - 7 werden separat gesammelt.

- 11 -

## 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Eluate 1 - 7 werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäure, 1 cm Durchmesser, 12,5 Füllhöhe

Säulenmaterial: Source RPC 15  $\mu$ m (Pharmacia, Freiburg)

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Das Eluat wird in 4 ml-Fraktionen gesammelt.

## 3. Kartierung der Peptid-Fraktionen

### 3.1

Aliquots der in 2.2 gewonnenen Fraktionen werden auf einer Microbore-Reverse-Phase-Säule aufgetragen und im Gradient eluiert. Die Detektion erfolgt mit UV-Detektor und on-line mit einem Elektrospray-Massenspektrometer.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftragen: 20  $\mu$ l/min

Fluß beim Eluieren: 20  $\mu$ l/min

Detektion: 220 nm

Säule: C18 AQS, 3  $\mu$ m, 120 Å, 1 mm Durchmesser, 10 cm Länge  
(YMC, Schermbeck)

Anlage: ABI 140 B Dual solvent Delivery System

Puffer A: 0,06% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 90 min

- 12 -

On-Line-Massenspektrometrie:

API III mit Elektrospray-Interface (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Positive Ion Modus

Meßbereich:  $m/z$  von 300 bis 2.390

Scan-Zeit: 7 sec

Scan-Fenster: 0,25  $m/z$

Datenerfassung erfolgt mit MacSpec oder MultiView Software (Perkin-Elmer).

### 3.2 MALDI-MS Messung der einzelnen Fraktionen

Aliquots der in 2.2 gewonnen Fraktionen werden mit unterschiedlichen Matrixsubstanzen, z. B. unter Zusatz von L(-) Fucose im MALDI-MS gemessen.

Aus den Rohdaten wird eine mehrdimensionale Tabelle erstellt unter Berücksichtigung der Scan-Nummer, Signalintensität und nach Kalkulation der Massen aus den multipel geladenen Ionen eines Scans.

## 4. Vergleichende Analyse

### 4.1 Identifikation neuer, fehlender oder in ihrer Menge deutlich verschiedener Peptide

Durch Vergleich der unter 3.3 erhaltenen Datensätze, die auch als Peptidkarten bezeichnet werden können, werden qualitative und/oder quantitative Unterschiede festgestellt. Dabei werden unter Berücksichtigung von Kontrollen und Proben einzelne Datensätze oder auch Gruppen von Datensätzen zum Vergleich herangezogen.

#### 4.2 Peptidchemische Charakterisierung der identifizierten Targets

Aus dem gewonnen Rohmaterial (z. B. Großpräparationen von Hämofiltrat) werden die identifizierten Targets in Mengen aufgereinigt, die eine Identifikation erlauben. Dazu werden die unterschiedlichen, dem Fachmann bekannten chromatographischen Trenntechniken (Reverse Phase, Ionenaustausch, Ausschlußgrößenchromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie etc.), die im allgemeinen zur Auftrennung von Peptidgemischen eingesetzt werden, verwendet. Nach jeder chromatographischen Trennung einer Fraktion werden über ESI-MS, MALDI-MS oder auch LC-MS die Targets erneut in den Fraktionen identifiziert. Dieses Procedere wird unter Variation der chromatographischen Parameter so oft wiederholt, bis ein reines Produkt der gesuchten Spezifikation, d. h. Retentionszeit und molekularer Masse, vorliegt. Darauf folgt die Bestimmung einer Teil- oder Komplet-Aminosäuresequenz oder eines Fragmentmusters. Im Anschluß wird ein Datenbankvergleich durchgeführt an den bekannten Datenbanken (Swiss-Prot und EMBL-Peptid- und Nucleinsäure-Datenbank) mit dem Ziel der Identifikation der Teil- oder Kompletsequenz oder eines Fragmentmusters. Ist kein Datenbankeintrag vorhanden, erfolgt die Aufklärung der Primärstruktur.

#### Beispiel 2:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Aszites

##### 1. Gewinnung von Aszites

Aszites bildet sich als extravasales Exsudat bei unterschiedlichen Erkrankungen (maligne Tumoren, Leberstörungen etc.). Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens werden zwischen 10 ml und 10 l Aszites durch Punktion gewonnen und danach zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 einge-

- 14 -

stellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

## 2. Gewinnung der Aszites-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

### 2.1. Peptidextraktion mit Gradienten-Elution

5 l Aszites-Filtrat werden auf pH 2,0 eingestellt und über eine präparative Reverse-Phase-Säule getrennt.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag 40 ml/min

Fluß beim Eluieren: 40 ml/min

Detektion: 214 nm, 280 nm

Säule: Waters Kartuschensystem, 4,7 cm Durchmesser, 30 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Vydac RP-C18, 15 - 20 µm

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 3,000 ml

Das Eluat wird in 50 ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

### Beispiel 3:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Urin

#### 1. Gewinnung von Urin

Urin wird direkt als Katheterurin oder als Spontanurin von Patienten in Mengen von 0,5 bis 50 l gewonnen und zur Ver-

- 15 -

meidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 eingestellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

## 2. Gewinnung der Urin-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

### 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Urin-Filtrat werden mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit HCl auf 2,7 eingestellt. Das Urin-Filtrat wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der Peptide werden die gebundenen Peptide mit einem Kochsalzgradienten eluiert.

#### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Merck Fraktogel TSK SP 650 M

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 3,0

Puffer B: 1,5 M NaCl in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 2,000 ml

Das Eluat wird in 10 Pools á 200 ml gesammelt.



## 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Fraktionen werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäule, 1 cm Durchmesser, 12,5 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Pharmacia Source RPC 15  $\mu$ m

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 200 ml

Das Eluat wird in 4ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hoch- und niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei
  - niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und
  - mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe Gewebe- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus oder der Organismus selbst oder Kombinationen davon ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von höchstens 30 000 Dalton aufweisen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, mindestens ein Molekulargewicht, das dem von Dipeptiden entspricht, aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 3 und/oder 4, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von 100 bis 10 000 Dalton aufweisen.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die hochmolekularen Peptide vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide abgetrennt werden oder meßtechnisch oder auswertetechnisch bei der Erfassung der Probe nicht berücksichtigt werden.

- 18 -

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Erfassung der niedrigmolekularen Peptide durch Massenspektrometrie erfolgt.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die niedrigmolekularen Peptide durch die Messung ihres Molekulargewichtes charakterisiert werden.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Probe vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide in verschiedene Fraktionen aufgeteilt wird und unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wird.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei als Organismus Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen aus Tieren und Menschen dienen.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Probe aus genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen stammt.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Erfassung des Status des Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus, zur Aufdeckung eventueller Abweichungen von einem Referenzzustand, dient.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Erfassung des Status eines transformierten Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus zur Aufdeckung von Veränderungen des transformierten Organismus dient, zur Aufdeckung von mit der Transformation verbundenem Auftreten von Peptiden, die kausal mit Stoffwechseleränderungen zusammenhängen.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Anmelde Aktenzeichen

PCT/EP 97/04396

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341-345, XP002050736	1,2,10, 12
A	siehe das ganze Dokument	3-9,11, 13
X	M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124-129, XP002050737	1,2,10, 12
A	siehe das ganze Dokument	3-9,11, 13
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/01/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Van Bohemen, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Aktenzeichen

PCT/EP 97/04396

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA,            Bd. 94, Nr. 17, 1997, BETHESDA MD USA,            Seiten 9481-9486, XP002050738            siehe Seite 9481, Spalte 1, Zeile 1 -            Spalte 2, Zeile 19</p> <p>-----</p>	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04396

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, vol. 6, no. 3, 1987, NEW YORK NY USA, pages 341-345, XP002050736	1, 2, 10, 12
A	see the whole document	3-9, 11, 13
X	M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 275, no. 2, 1983, BERLIN FRG, pages 124-129, XP002050737	1, 2, 10, 12
A	see the whole document	3-9, 11, 13
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 1997

Date of mailing of the international search report

14/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 97/04396

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA,            vol. 94, no. 17, 1997, BETHESDA MD USA,            pages 9481-9486, XP002050738            see page 9481, column 1, line 1 - column 2, line 19</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13